



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 G01N 33/543	A1	(11) 国際公開番号 WO98/40740
		(43) 国際公開日 1998年9月17日(17.09.98)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00857</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月2日(02.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/72649 1997年3月10日(10.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本製薬株式会社 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒170-0002 東京都豊島区巣鴨二丁目11番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 奥 裕一(OKU, Yuichi)[JP/JP] 田中良樹(TANAKA, Yoshitatsu)[JP/JP] 大塚洋子(OTSUKA, Yoko)[JP/JP] 〒307-0036 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日本製薬株式会社 研究本部内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 光来出良彦(MITSUKUDE, Yoshihiko) 〒101-0063 東京都千代田区神田淡路町2-1 T金井ビル Tokyo, (JP)</p>		(81) 指定国 CA, IL, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
<p>(54) Title: ANALYTICAL METHOD, KIT, AND APPARATUS</p> <p>(54) 発明の名称 分析方法、キット及び装置</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Analytical method, kit, and apparatus which, in one analytical apparatus, can simultaneously judge the presence or absence of at least one biological substance with higher sensitivity or can determine the amount of the at least one biological substance. A reagent containing at least one marker-labeled ligand and at least one nucleic acid-labeled ligand is brought into contact with a liquid sampled containing at least one analyte to form at least one complex. The resultant at least one composite is developed in a developing element sheet (11) by a capillary phenomenon. Anti-binders, for which detection zones (15, 16, 17) are formed for each of at least one nucleic acid immobilized onto the detection zone (14), are captured by complementary binding of the nucleic acid. The composite is captured for each of the analyte by complementary binding between the anti-binder and the binder to form separate bands, thereby assaying the amount or presence of the detection site.</p>		
<p> A ... Antigen A B ... Antigen B C ... Antigen C </p>		

(57) 要約

1種類以上の生物学的物質を一つの分析装置において、より高感度に、同時にその有無の判定、或いはその量の測定を可能にする分析方法、そのキット及び装置を提供する。1種類以上のマーカー標識化配位子と、1種類以上の核酸標識化配位子を含む試薬と、1種類以上の分析物を含む液体試料を接触させて1種類以上の複合体を形成させ、形成された1種類以上の複合体を、シート状の展開要素11中に毛管現象により展開させ、検出ゾーン14に固定化された核酸からなる1種類毎に検出ゾーン15, 16, 17が形成された抗結合子に対して、核酸の相補的結合により捕獲し、前記抗結合子-結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させ、検出部位の量又はその存在を検定する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジラント
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャード
AU	オーストラリア	GB	英國	MC	モナコ	TG	チヤード
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	ベルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサオ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BJ	ベンイン	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	US	米国
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	NE	ニジエール	VN	ヴィエトナム
CA	カナダ	IL	イスラエル	NL	オランダ	YU	ユーゴースラヴィア
CF	中央アフリカ	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	JP	日本	PL	ポーランド		
CI	コートジボアール	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KG	キルギス	RO	ルーマニア		
CN	中国	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CU	キューバ	KR	韓国	SD	スードан		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SG	シンガポール		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SI	スロヴェニア		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SK	スロ伐キア		
EE	エストニア	LR	リベリア	SL	シエラ・レオネ		
ES	スペイン	LS	レソト				

明 細 書
分析方法、キット及び装置

技術分野

5 本発明は、生物学的物質を分析の対象とした分析物の量の測定、あるいは有無を検定するための簡易臨床診断に有用な分析方法、該方法に使用するキット及び装置に関し、特に、液体試料に含まれる一種類以上の分析物の量或いは有無を一度に膨大な組合せが実現できる分析方法、該方法に使用するキット及び装置に関する。

10

背景技術

臨床検査において患者の罹患している疾病を決定する際には、數種の検査結果を総合して判断することが行われている。患者は的確な診断と治療を受けるために数種類の検査を受けることが一般的である。しかしながら、従来の技術では1種類の臨床診断試薬で1種類の項目しか測定、あるいは検出することができない場合がほとんどであるために、検査数に比例して患者から採取される検体量は増加し、患者の身体的な負担の一つとなっている。

一方、従来の免疫学的な検査を行う場合、通常、自動装置などを用いて検査を行う必要があるために、採取された患者の検体は自動分析装置のある施設に運搬され、そこで検査が行われ、得られた結果が医師に伝えられ、そのようにして結果と患者の臨床的な症状により診断が行われている。そのため、医師がすぐに診断を下すことができずに治療のタイミングを逸する原因の一つとなっていた。

25 近年、こうした問題を解決できるように、免疫反応とクロマトグラフィーを組み合わせた方法（以下、イムノクロマト法と略記する。）が開発された。従来のイムノクロマト法の標準的な原理を次に

説明する。

従来のイムノクロマト法に使用される分析装置は、ニトロセルロース膜などの多孔質性でシート状の展開要素の一端に、分析物を含む液体試料を適用するための適用ゾーンが設けられ、他方端に展開要素を毛管現象により移動してきた液体を受入れるための吸水ゾーンが設けられ、それらの間で適用ゾーンに近い側にマーカー標識化免疫物質が含まれている封入ゾーンが配置され、適用ゾーンに遠い側に、分析物と標識化物からなる複合体を結合するための免疫物質が固定された検出ゾーンが配置されたものである。

このような分析装置を用いた分析方法は、まず測定すべき分析物を含む液体試料が、適用ゾーンに適用されると、液体試料は毛管現象により、マーカー標識化免疫物質が含まれる封入ゾーンに移動する。該封入ゾーンにおいて、マーカー標識化免疫物質と分析物が免疫学的親和性により結合し、マーカー標識化免疫複合体が形成される。該マーカー標識化免疫複合体は、毛管現象及び／又は拡散により、展開要素を展開移動して検出ゾーンに達し、該検出ゾーンに固定化されている免疫物質によって捕獲される。該検出ゾーンで捕獲されたマーカー標識化免疫複合体中のマーカーについて測定あるいは検出することによって、液体試料中に含まれている分析物の量の測定あるいはその存在を検定することができる。

この方法は、免疫化学的活性物質の測定検出のひとつである酵素免疫測定法などに比べ、測定途中で洗浄操作が不要で、また目視により検定が可能であるのでマーカーを検出するための測定装置も特に必須ではなく、さらに分析装置に含まれる試薬が乾燥状態で保たれるために室温で長期保存が可能という点に特徴を有する。このような従来のイムノクロマト法によれば、医師が採取した検体を直ちに医師自身が検査することができるので、患者の臨床的な症状と免

疫学的な検査結果を総合して医師が短時間で診断をくだすことができ、そのため、治療のタイミングを逸してしまうことは少なくなるという利点がある。

イムノクロマト法に関してはいくつかの特許が公開されている。

5 例えば、特公平7-13640号公報に記載のイムノクロマト法は、前述の従来のイムノクロマト法と基本的に同一であり、不溶性小胞マーカーに結合したリガンドを使用し、且つ該不溶性小胞マーカーが、着色リポソーム、着色重合体ビーズ、金属又は重合体染料粒子である点に特徴を有する。しかしながら、該公報には同時に1種
10 以上の抗原あるいは抗体等の生物学的物質の定量あるいは検出については何も示唆されていない。

また、特許第2504923号明細書に記載のイムノクロマト法は、前述の従来のイムノクロマト法と基本的に同一であり、検出ゾーンで捕獲される複合体がマーカー標識化受容体-分析物-受容体
15 からなる、いわゆるサンドイッチアッセイ法による分析や、生物学的親和特性の異なる第1被分析物と第2被分析物の同時検出の示唆がなされている。しかしながら、該公報には、マーカー標識化免疫複合体が核酸塩基の相補的な結合により検出ゾーンにおいて捕獲されることについて、また被分析物の種類が2個よりも多い場合の適用性及びその場合の測定感度については何も示唆されていない。

一方、免疫学的分析法において、多くの免疫化学的活性物質を固相化できる方が、より高感度化が図れ、おなじ量の免疫化学的活性物質を短時間で検出できる。そのために、イムノクロマト法においてもより高感度な分析技術の出現が望まれてきた。

25 そこで、本発明の目的は、1種類以上の生物学的物質を一つの分析装置において、より高感度に、同時にその有無の判定、或いはその量の測定を簡易な手段で可能にする臨床診断に有用な分析方法、

その分析に使用されるキット及び装置を提供することである。

発明の開示

本発明の分析方法の一つの態様は試薬と分析装置が別体となって
5 いるキットを使用する分析方法である。該分析方法は、液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、(1) 第一配位子にマーカーが結合されてなる 1 種類以上のマーカー標識化配位子を含み、且つ第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合
10 子が結合されてなる 1 種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬と、1 種類以上の分析物を含む液体試料を接触させて、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマーカー標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体を 1 種類以上形成させること、(2) 形成された 1 種類以上の複合体を、シート状の展開要素中に毛管現象により展開させること、(3) 前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させること、(4) 前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカーを測定又は検定することを含むことからなる。

本発明の分析方法の別の態様は試薬が一体となって含まれている分析装置を使用する方法である。該分析方法は、液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、(1) 1 種類以上の分析物を含む液体試料をシート状の展開要素に適用して、展開要素中を毛管現象により展開させるこ

と、(2) 分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる1種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬成分が封入されている封入ゾーンに前記液体試料を移動させ接触させること、(3) 前記試薬と液体試料との接触により形成された、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマーカー標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体の1種類以上、或いは形成されつつある反応物を毛管現象により該展開要素中に展開させること、(4) 前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させること、(5) 前記検出ゾーンで形成された帶に含まれるマーカーを測定又は検定することを含むことからなる。

また、本発明の分析キットは、試料中に存在する1種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析キットであって、該分析キットは、下記の試薬、及び該試薬とは別体の分析装置から構成される。即ち、本発明の分析キットにおいて、試薬は、分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる1種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位

子を含む試薬である。前記分析装置は、シート状の展開要素を有し、該展開要素は毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開でき、前記別体の試薬に含まれる結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる1種類以上の抗結合子が、種類毎に独立して該展開要素の検出ゾーンに固定されてなるものであり、分析物が含まれる液体試料と前記試料との混合物が適用された場合、検出ゾーンにおいて、結合子と抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させることができる。

10 また、本発明の分析装置は、前記分析キットに含まれる、分析装置であることを特徴とする。

また、本発明の分析装置は、試料中に存在する1種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析装置であって、該分析装置は、（1）毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開できるシート状の展開要素、（2）前記シート状の展開要素の一端に位置し、液体試料を外部から受入れ可能で、受入れた液体試料を他方端に達するのに充分な供給能力を持ち、後記する試薬が封入された封入ゾーンに対して分析すべき液体試料を供給することができる、該液体試料を外部から受け入れるための適用ゾーン、（3）分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる1種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬が含まれている前記展開要素の前記適用ゾーンに近い位置に配置された封入ゾーン、（4）前記展開要素中を拡散してきた分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物

を受け入れることができ、且つ前記適用ゾーンとは離れた位置に配置された吸水ゾーン、(5)前記封入ゾーンと前記吸水ゾーンとの間に位置し、前記結合子に対して相補的な塩基配列を有する抗結合子が1種類以上独立して固定されており、分析物の種類毎にマーカー標識化配位子、分析物、及び結合子標識化配位子から形成された複合体を捕捉して検出できる検出ゾーンを含むことを特徴とする。

本発明によれば、1種類以上の分析物の分析が単一のキット或いは装置で、高感度に測定することが可能となる。

本発明において「配位子」とは、分析物に対して生物学的親和性を有し、分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができ、結合してペアを形成することができる一方の分子である。本発明において「第一配位子」及び「第二配位子」とは、同一の性質を有するものであっても、異なってもよい。また、分析物が抗原である場合、第一配位子、第二の配位子は抗体とすることができる、分析物が抗体である場合は、第一配位子、第二の配位子は抗原とすることができます。また、分析物と配位子との組合せの他の例には、受容体とこれに結合するリガンドとの組合せ、核酸とこれに結合する相補的な核酸との組合せ、レクチンとこれに結合する特異的な糖との組合せも包含される。

本発明において「結合子」とは、分析物とは結合せず、配位子とは異なる反応性を有する核酸である。本発明において「抗結合子」とは、「結合子」の塩基配列に少なくとも部分的に相補的な塩基配列を有する核酸であり、結合子と相補的に結合する。「結合子」と「抗結合子」との結合の組合せは、結合子及び抗結合子を構成する核酸分子の塩基配列によって無限といえる程の膨大な組合せが可能となる。結合子と抗結合子の相補的結合の観点から、各々の塩基配列が部分的に相補的に対応しているものでもよく、また互いの相補

的塩基配列が完全に一致しているものでも良い。結合子、抗結合子となる核酸には、具体的にはDNA、RNA、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドが使用でき、好ましくは10mer以上100mer以下の長さのオリゴヌクレオチドが好ましい。

- 5 検出ゾーンにおいて抗結合子は展開要素に直接的或いは他の物質を介して間接的に結合して固定されている。例えば、核酸の5'又は3'末端、或いは核酸を構成する塩基に導入された官能基を介して、展開要素として不溶性支持体に含まれる官能基と、抗結合子である核酸を共有結合させることにより展開要素に直接的に固定する
10 ことができる。抗結合子は分析すべき1種類以上の分析物の種類に応じてそれぞれ異なる塩基配列が予め決定されており、展開要素の検出ゾーンに種類毎に独立してゾーンをなして固定されている。

核酸の5'又は3'末端基に導入されたビオチン、或いは核酸を構成する塩基に導入されたビオチンを介して、展開要素として不溶性支持体に予め結合させたアビジン或いはストレプトアビジンと結合させることにより、抗結合子である核酸を展開要素に間接的に固定することができる。また、核酸の5'又は3'末端、或いは核酸を構成する塩基に導入された官能基を介して、核酸をタンパク質に結合させ、この核酸結合タンパク質を展開要素としての不溶性支持体に結合させることにより、抗結合子である核酸を間接的に展開要素に固定することができる。

本発明において使用される試薬成分には、第一配位子にマーカーが結合されてなる「マーカー標識化配位子」、及び第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる「結合子標識化配位子」が使用される。試薬成分は、展開要素と別体となって、展開要素と組合せ使用されるべきキットを構成することができる。また、試薬成分は、展開要素の

封入ゾーンに乾燥した状態で保持されていてもよい。

マーカー標識化配位子に含まれるマーカーには、具体的には酵素学的に活性な分子、ジゴキシゲニン、金属コロイド、着色ラテックス、着色リポソーム、核酸、ビオチン、アビジン、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素などを使用することができる。なお、着色とは肉眼的に識別できる色を付着させることに限らず、蛍光物質、発光物質を付着させることも包含する。
5

本発明において「展開要素」は、シート状をなしており、毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物をクロマトグラフ的に展開できる。好適な展開要素には、多孔質不溶性支持体が使用でき、具体的にはプラスチック製多孔質支持体、セルロース系多孔質支持体、無機系多孔質支持体が使用でき、さらに具体的には、多孔質の、セルロース、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、シリカ、またはこれらの誘導体などが挙げられ、展開要素に形成された複数のゾーン毎に材料を変えたり、組み合わせて使用することができる。場合によっては、複数のゾーンは一方の面を、同一の素材あるいは異なる素材によって補強されている場合もある。また、これらのゾーンは、分析が行なわれないときは通常、乾燥して存在する。
10
15

20

図面の簡単な説明

図1は、分析物が1種類以上を対象とした本発明の分析キットの構成要素の一方である試薬の一例を模式的に示す。

図2は、本発明の分析キットの構成要素の他方である分析装置の一例を模式的に示す。
25

図3は、図1及び図2に示される分析キットを用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲

された様子を模式的に示す。

図 4 は、本発明の分析装置の別の態様を示し、試薬が装置の中に乾燥状態で一体となって含まれている分析装置である。

図 5 は、図 4 の分析装置の使用例として、目的とする分析物を抗
5 抗原 A、抗原 B、抗体 C とする場合に、分析装置の封入ゾーン 1 8 に
乾燥状態で含まれている試薬の構成を示す。

図 6 は、図 4 に示される分析装置を用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲された様子を模式的に示す。

10 図 7 は、分析物が核酸である場合において、本発明に従って、検出ゾーンで核酸が捕獲される原理を示し、分析物はオリゴヌクレオチド ON 3 とオリゴヌクレオチド ON 2 をその配列中に含む核酸である。

15 図 8 は、分析物が抗原であり、抗原を検出するための分析装置として、検出ゾーンにおいて、IgG 抗体に抗結合子として核酸が導入された核酸標識化 IgG 抗体が不溶性担体に固定されている場合を示す。

図 9 は、図 8 に示す検出ゾーンにおいて、サンドイッチ免疫複合体が捕獲された状態を示す。

20 図 10 は、アビジンを物理吸着により検出ゾーンに固相化してなるア固相化アビジンに対して、核酸にビオチンを導入してなるビオチン化核酸を結合させることにより、核酸をビオチンーアビジンの反応により固相化したものである。

25 図 11 は、図 10 に示すビオチンーアビジンの反応により固相化した核酸とは別の態様の固相化核酸を示し、図 10 に示す核酸-ビオチンーアビジン複合体にさらに、核酸-ビオチンーアビジン複合体を核酸の相補的結合により結合させて核酸を固相化したものであ

る。

図 1 2 は、本発明の分析装置としてのテストストリップをケースに収容する手段を示す。

図 1 3 は、実施例 5 で使用したストリップ状の分析装置を示す。

5 図 1 4 は、実施例 8 に使用した分析装置を示し、その分析装置の長手方向切断面である。

図 1 5 は、実施例 8 に使用した分析装置を示し、その分析装置の側面面である。

図 1 6 は、実施例 8 に使用した分析装置を示し、その分析装置の

10 上面図である。

発明を実施するための最良の形態

図 1 は、分析物が 1 種類以上を対象とした本発明の分析キットの構成要素の一方である試薬の一例を模式的に示し、目的とする分析物が 3 種類の抗原、即ち、抗原 A、抗原 B、抗原 C の場合である。

図 1において、枠で囲ってある部分は全て一つの試薬中に含まれる成分であり、該試薬は乾燥状態でも、液体中に存在していてもよい。

図 1 中、 α A、 α B、 α C は、各々抗原 A、抗原 B、抗原 C に対する抗体を示す。この抗体 α A、抗体 α B、抗体 α C には各々マー

20 カーが結合されて、マーカー標識化抗体となっている。各抗体に導入されるマーカーは同一のものであっても、異なるものであってもよい。この試薬中には、さらに抗体 α A、抗体 α B、抗体 α C に各々異なる配列の、オリゴヌクレオチド ON 1、オリゴヌクレオチド

ON 2、オリゴヌクレオチド ON 3 が結合された 3 種類の抗体－オ

25 リゴヌクレオチド結合体が前記 3 種類のマーカー標識化抗体と同時に含まれている。分析キットを構成する試薬は液状であっても、乾燥状態であってもよい。

図 2 は、本発明の分析キットの構成要素の他方である分析装置の一例を模式的に示し、図 1 の試薬と組み合わせて使用される。図 2において、1 は多孔質シートの帯片からなる展開要素、2 は該展開要素 1 の一端に設けられ、適用される液体試料と試薬混合物を吸収し、展開要素 1 へ供給するための適用ゾーン、3 は展開要素中を移動拡散してきた、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を受け入れることができる吸収ゾーンである。前記適用ゾーン 2 と吸収ゾーン 3との間に、検出ゾーン 4 が設けられ、オリゴヌクレオチド O N 1 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド O N 1' が固定された第 1 検出ゾーン 5、オリゴヌクレオチド O N 2 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド O N 2' が固定された第 2 検出ゾーン 6、オリゴヌクレオチド O N 3 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド O N 3' が固定された第 3 検出ゾーン 7 が種類毎に各々独立して縞状となっている。

図 1 の試薬と図 2 の展開要素との組合せからなる分析キットを用いた簡易臨床診断方法を次に示す。分析物として抗原 A、抗原 B、抗原 C が含まれる液体試料を用い、容器中にて試薬と混合し、免疫学的親和性反応を行わせる。得られた反応液を展開要素 1 の適用ゾーン 2 へ適用する。この反応液の適用は、適用ゾーン 2 を反応液中に浸漬してもよいし、反応液を適用ゾーン 2 へ滴下、或いは塗布等により与えてもよい。反応液には、分析物、試薬、及び分析物と試薬とが複合化したマーカー標識化免疫複合体が含まれる。該反応液は、展開要素 1 中を毛管現象により移動又は拡散して、検出ゾーン 4 に移動し、ここで、マーカー標識化免疫複合体は、分析物の種類毎に塩基配列が予め定められた固定されたオリゴヌクレオチドと、マーカー標識化免疫複合体中に含まれるオリゴヌクレオチドとの相補的結合によりマーカー標識化免疫複合体が捕獲される。図 3 に、

図 1 及び図 2 に示されるキットを用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲された様子を模式的に示す。

本発明の試薬成分のマーカー標識化配位子に含まれる第一配位子と、核酸標識化配位子に含まれる第二配位子は、同一の反応性を有するものであっても、また異なる反応性を有するものであってもよい。また、第一配位子と第二配位子との組合せは、同一の抗原に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せ、ポリクローナル抗体相互の組合せ、結合部位の異なるモノクローナル抗体相互の組合せであってもよい。
5
10

液体試料中に含まれる分析対象となる分析物が、同種のカテゴリーに属さない化合物の混合体に対しても本発明は分析が可能である。例えば、抗原、抗体、核酸の同時分析も行うことができる。また、上記のサンドイッチ方式に限定されず、種々のパターンの拮抗的
15
15

、或いは非拮抗的な分析手法が適用可能である。

核酸を構成する塩基配列は無限に近い膨大な種類が入手可能であるので、検出ゾーンで検出可能な分析物の種類数は幾らでも可能である。

図 4 は、本発明の分析装置の別の態様を示し、試薬が装置の中に乾燥状態で一体となって含まれている分析装置である。図 4 の分析装置において、1 1 は帯状の多孔質シートの帯片シートを主たる構成部材とし必要に応じて補強シートが貼着された展開要素、1 2 は該展開要素 1 1 の一端に設けられ、適用される液体試料を吸収し、試薬を含んでいる封入ゾーン 1 8 及び展開要素 1 1 へ液体試料を供給するための適用ゾーン、1 3 は展開要素 1 1 中を移動拡散してきた、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を受け入れることができる吸収ゾーンである。前記図 2 に示す分析装置との差異は、図
20
25

4には、展開要素11と適用ゾーン12の間に、試薬を含ませた封入ゾーン18が設けられており、適用ゾーン12から封入ゾーン18へ供給される液体試料が展開要素11に移動できるように両者に緊密に接触している。

5 封入ゾーン18と吸収ゾーン13との間の展開要素11には、検出ゾーン14が設けられ、試薬の構成要素として含まれるオリゴヌクレオチドON1に対して相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON1'が固定された抗原A分析用の第1検出ゾーン15、オリゴヌクレオチドON2に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON2'が固定された抗原B分析用の第2検出ゾーン16、オリゴヌクレオチドON3に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON3'が固定された抗体C分析用の第3検出ゾーン17が種類毎に各々独立して縞状となっている。

15 図4の分析装置の使用例として、目的とする分析物を抗原A、抗原B、抗体Cとし、分析すべき液体試料中に実際に抗原Aと抗体Cのみが含まれていた場合について次に説明する。図5は、その場合に分析装置の封入ゾーン18に乾燥状態で含まれている試薬の構成を示す。本態様の試薬構成は、図1の試薬構成と比較して、マーカー標識化抗体 α Cがマーカー標識化抗原Cに、またオリゴヌクレオチドON3標識化抗体 α CがオリゴヌクレオチドON3標識化抗原Cに変更されているのみである。

20 まず分析物として抗原A及び抗体Cを含む液体試料が適用ゾーン12に適用されると、これらの分析物は毛管現象により、試薬成分と共に移動しながら、抗原Aはマーカー標識化抗体 α A及びオリゴヌクレオチドON1標識化抗体 α Aとサンドイッチ免疫複合体を形成し、抗原A分析用の第1検出ゾーン15に達し、そこでオリゴヌクレオチドの互いの相補的な塩基配列により捕獲される。また抗体

Cはマーカー標識化抗原C及びオリゴヌクレオチドON3 標識化抗原Cとサンドイッチ免疫複合体を形成し、抗体C分析用の第3検出ゾーン17に達し、そこでオリゴヌクレオチドの互いの相補的な塩基配列により捕獲される。しかし、液体試料中に抗原Bは存在していないため、サンドイッチ免疫複合体は形成されず、抗原B分析用の第2検出ゾーン16では、オリゴヌクレオチドON2 標識化抗体 α Bが捕獲される。このようにして各検出ゾーン15、16、17において捕獲されたサンドイッチ免疫複合体に含まれるマーカーについて、抗原A及び抗体Cの量の測定又は存在の検出が行なわれ、抗原Bは存在しないことが分かる。図6に、図4に示される分析装置を用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲された様子を模式的に示す。

図7は分析物が核酸である場合において、本発明に従って、検出ゾーンで核酸が捕獲される原理を示す。図7において、分析物43はオリゴヌクレオチドON3とオリゴヌクレオチドON2をその配列中に含む核酸である。なお、分析物は一重鎖の核酸であっても、二重鎖の核酸であっても適用可能である。検出ゾーン40に固定化されている抗結合子41はオリゴヌクレオチドON1を含む核酸である。試薬成分としては、マーカー標識化配位子44と核酸標識化配位子42からなり、該マーカー標識化配位子44は、分析物43中のオリゴヌクレオチドON3に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON3'を有する核酸とマーカーが結合されたものであり、該核酸標識化配位子42は分析物43中のオリゴヌクレオチドON2に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON2'と検出ゾーン40に固定化されている抗結合子41のオリゴヌクレオチドON1に相補的な塩基配列を有する結合子としてのオリゴヌクレオチドON1'をその配列中に含む核酸である。

これらの試薬を含む本発明の分析キット又は分析装置を用いて目的とする核酸分析物の捕獲された結合モデルが図7に示される。試薬及び液体試料が本発明の分析装置中の展開要素に展開中に、分析物、試薬及び固定化抗結合子との相互反応により、抗結合子41の
5 オリゴヌクレオチドON1と核酸標識化配位子42のオリゴヌクレオチドON1'との相補的結合、核酸標識化配位子42のオリゴヌクレオチドON2' と分析物43のオリゴヌクレオチドON2との相補的結合、分析物43のオリゴヌクレオチドON3とマーカー標識化配位子44のオリゴヌクレオチドON3'との相補的結合が生じ、マ
10 カー及び分析物43を含んだ複合体が抗結合子41に捕獲される
。

本発明による分析方法によれば、免疫複合体等の生物学的親和性物質複合体の生成が、分析装置の適用前或いは適用後の早期に完了する。本発明の分析装置によれば、該生物学的親和性物質複合体の
15 捕獲に適用される結合子及び抗結合子としての核酸の相補的結合は、一致率が高く、安定性の高い反応であり、免疫反応よりも強力に行えるために、生物学的親和性物質複合体は効率よく固相に結合させることができる。したがって従来のイムノクロマト法よりも高感度化が実現できる。

逆に、核酸とこれに相補的な一致率が低い核酸との組合せを選択した場合は、安定性の低い核酸の反応は免疫反応よりも弱いために、強い力価の抗体を用いた場合に遭遇する、感度が高すぎるために抗体量を減少させるといったことを行わなくても、核酸の配列によって検出感度のコントロールを行うことができる。こうしたことは
25 、従来のイムノクロマト法では実現できなかったが、本発明により初めて実現できる特徴である。とくに、同時に複数項目を判定する必要がある場合は、それぞれの項目の正常域、異常域が異なってお

り、抗体の濃度、量を変化させるといったことが必要とされるケースがあるが、本発明の方法によればこの調整が大幅に簡略化される。

本発明における展開要素の検出ゾーン上に固定される抗結合子としての核酸の固定化手段には種々の方法が適用できる。抗結合子である核酸の5'末端または3'末端において、あるいは核酸の末端以外の任意の官能基の位置において、検出ゾーンの水不溶性担体に直接または導入された官能基を介してその核酸が共有結合されてもよい。また核酸に積極的に官能基を導入したものと、検出ゾーンの水不溶性担体に直接または導入された官能基を介してその核酸が共有結合されてもよい。

核酸の検出ゾーンへの別の固定化手段として、他の物質を介在させて結合を行ってもよい。例えば、物理吸着により検出ゾーンに固定化ができる物質に核酸を生物学的親和性結合、共有結合等によって結合させておいて、得られた結合物を物理吸着により検出ゾーンへ固定化してもよい。例えば、ヌクレオチドの5'末端または3'末端において、あるいはヌクレオチドの任意の位置に導入された官能基の位置において、検出ゾーンに物理吸着可能な他の物質と、官能基を介して共有結合したものを、検出ゾーンに吸着させることにより行うことができる。例えば、タンパク質は不溶性担体に物理吸着可能な物質であり、該タンパク質のアミノ基にSH基を導入し、該SH基とオリゴヌクレオチドの5'末端に導入したマレイミド基を反応させてなる共有結合されたタンパク質を、物理吸着により検出ゾーンに固定化することができる。

他の物質と核酸の結合は、上記のような共有結合以外に、生物学的親和性によるものでもよい。このような他の物質には、例えば、タンパク質が挙げられる。該タンパク質の例には、アビジン、牛血

清アルブミン、免疫グロブリン等が挙げられる。なお、免疫グロブリンが、分析物に対して免疫学的親和性を有するときには、分析物との免疫学的結合を利用することにより、さらに分析感度のアップが望める。

5 図 8 は、分析物が抗原であり、抗原を検出するための分析装置として、検出ゾーン 1 4において、IgG 抗体に抗結合子として核酸 20 が導入された核酸標識化 IgG 抗体 1 9 が不溶性担体に固定されている場合を示す。免疫化学的活性を有する核酸標識化 IgG 抗体 1 9 には核酸 20, 20 が 2 個導入されており、このような核酸 10 標識化 IgG 抗体 1 9 が検出ゾーン 1 4 に吸着されており、IgG 抗体を介して核酸 20 が固定化された状態となっている。

図 8 に示す検出ゾーン 1 4 において、サンドイッチ免疫複合体が捕獲された状態を図 9 に示す。図 9 において、核酸標識化 IgG 抗体 1 9 に捕獲される物質は、2 種類の免疫複合体が捕獲される。その一つは、分析物としての抗原 2 2、核酸標識化抗体 2 1 及びマー 15 カー標識化抗体 2 3 により形成されたサンドイッチ免疫複合体であり、そして他の一つは、マーカー標識化抗体 2 3 と抗原 2 2 により形成された免疫複合体である。

即ち、図 9 によれば、核酸 20 が導入された核酸標識化 IgG 抗 20 体 1 9 を検出ゾーン 1 4 に固定化することにより、抗原 2 2 の検出は、試薬成分としての核酸標識化抗体 2 1 中の核酸 2 4 と、検出ゾーン 1 4 に固定されている核酸標識化 IgG 抗体 1 9 中の核酸 20 の相補的結合により抗原が検出されるだけではなく、さらに加えて IgG 抗体自体の免疫化学的活性作用により結合された抗原 2 2 についても検出される。

従来法によれば、固定化された免疫化学的活性物質 1 分子に対して、2 分子の分析対象物しか結合できないが、本発明の該実施態様

によれば、従来法による分析よりも多くの分析対象物としての抗原が結合でき、この結果、多くの標識マーカーが結合できる。そのために、従来の分析法よりも、本発明の分析法による方が検出感度が高くなる。

5 図10は、アビジン25を物理吸着により検出ゾーン14に固相化してなるア固相化アビジンに対して、核酸27にビオチン26を導入してなるビオチン化核酸を結合させることにより、核酸27をビオチニアビジンの反応により固相化したものである。

10 図11は、図10に示すビオチニアビジンの反応により固相化した核酸とは別の態様の固相化核酸を示し、図10に示す核酸-ビオチニアビジン複合体にさらに、核酸-ビオチニアビジン複合体を核酸の相補的結合により結合させて核酸を固相化したものである。即ち、図10に示す手法により得られた核酸-ビオチニアビジン複合体を検出ゾーンに結合させておき、次いで、先に固定した核酸27とは相補的な塩基配列の核酸28にビオチン26を導入したビオチン化核酸とアビジン25からなる複合体を形成し、先の核酸-ビオチニアビジン複合体中の核酸27との相補的結合により、核酸28を有する複合体を結合させて、核酸28を固相化させたものである。

15 20 図11に示す手段により得られた核酸固相化検出ゾーンは、検出ゾーン上において3次元的に成長しており、図10に示す態様の核酸固定化手段よりも多くの抗結合子としての核酸を含ませることができるので、より多くの免疫複合体の捕獲が可能となり、検出感度が高くなる。

25 上記2種の態様に用いたアビジンの代わりにストレプトアビジンを用いることによっても同様に、核酸結合不溶性支持体を調製することが可能である。上記のようにして、本発明の分析装置を得る。

本発明の分析装置はテストストリップ単独として使用することができ、また、該テストストリップをケースに入れて使用することもできる。一般的に、患者から採取された血液、血清、血漿などは、感染性の微生物が混入している可能性も高いために、本発明の分析
5 装置をテストストリップ単独として使用するには、感染の可能性の問題も考慮する必要がある。この感染の問題点を軽減し、手で直接テストストリップを触れることなく扱うことのできる方法として、テストストリップをプラスチック製ケース等の保護ケースに入れ取り扱うことは好ましい態様である。

10 テストストリップをケースに収容する手段には、例えば、図12に示す手段が使用できる。即ち、2つの穴のあるプラスチック製ケース29の中にテストストリップを封入しておき、一方の穴は、テストストリップの適用ゾーンに対応した試料適用口30であり、他方の孔は、テストストリップの捕捉用核酸が結合している検出ゾーン14において、分析物が捕獲された様子が観察できるような検出窓31となっている。このプラスチック製ケース29に入れたテストストリップにより、微生物による検査を行っている人への検体による感染の可能性を大幅に軽減することが可能となる。該プラスチック製ケース29の材料として好適なプラスチックの例には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、アクリル樹脂、エチレン塩化ビニル、フッ化ポリビニデン等が挙げられる。
15
20

次に、実施例に基づき本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1

工程1：ビオチン化オリゴヌクレオチドの調製

25 5'末端にアミノ基を有する以下のようなオリゴヌクレオチドをパーキンエルマー社製DNA合成装置391Aを用いて、それぞれ合成した。

アミノ基 - G A A T T C C C G G G G A T C C G T C
G (以下、ペア 1 +)

アミノ基 - C G A C G G A T C C C C G G G A A T T
C (以下、ペア 1 -)

5 アミノ基 - A A C G G A A T C T A A T C A G G A G
G (以下、ペア 8 +)

アミノ基 - C C T C C T G A T T A G A T T C C G T
T (以下、ペア 8 -)

これらのオリゴヌクレオチド 300 nmol をそれぞれ 1 mM
10 EDTA を含む 0.1 M MOPS 緩衝液 pH 7.0 に溶解した溶液中に、N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン（ピアス社製 N
H S - B i o t i n) 30 μmol を N' , N' -ジメチルホルム
アミド (以下、D M F) に溶解した溶液をそれぞれ加え、37°C 1
時間反応させた。反応後、エタノール沈殿法によりビオチン化した
15 オリゴヌクレオチドを分離した。この操作により、いずれの配列も
ほぼ 80 ~ 90 % のビオチン化したオリゴヌクレオチドが回収でき
た。

工程 2 : 抗 H B s 抗体及び抗 C R P 抗体の調製

B 型肝炎表面抗原 (以下 H B s) に対する抗体は、明治乳業 (株)
20) より購入した H B s を定法通り、ウサギあるいはマウスに免疫し
、ウサギからはポリクローネ抗体をマウスからはクローニングを行
いモノクローネ抗体を調製した。また、C 反応性タンパク質 (以下
C R P) に対する抗体は、札幌臨床検査センターより購入した C R
P を定法通り、ウサギあるいはマウスに免疫し、ウサギからはポリ
25 クローネ抗体をマウスからはクローニングを行いモノクローネ抗体
を調製した。それぞれの抗体は I g G まで精製し、以下の実験に供
した。

工程 3 : 金コロイド標識化抗 H B s 抗体及び金コロイド標識化抗 C R P 抗体の調製

前記工程 2 で得られたウサギポリクローン抗 H B s 抗体を金コロイドにより標識した。すなわち、ザイメッド社製粒径 10 nm の金
5 コロイドを、ソフトサイエンス社刊 横田ら編 イムノゴールド法 (1992) に従って、金コロイド標識ウサギポリクローン抗 H B s 抗体を調製した。また、同様に前記工程で得られたマウスモノクローン抗 C R P 抗体を金コロイドにより標識した。

工程 4 : オリゴヌクレオチド標識化抗体（ペア 8 + 標識化抗 C R P - I g G、ペア 1 - 標識化 B S A、ペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G）の調製

前記工程 2 で得られたウサギポリクローン抗 H B s - I g G · 1
0 mg を 0.2 M ほう酸ナトリウム緩衝液 pH 8.5 · 2.3 ml
に溶解し、ここに無水 S - アセチルメルカプトコハク酸 1.33 m
15 g を溶解させた D M F 0.25 ml を添加し、37 °C 1 時間反応させた。反応後、1 M T r i s 塩酸緩衝液 (pH 7.0) と 1 M
ヒドロキシルアミン (pH 7.0) をそれぞれ 0.5 ml づつ添加し、37 °C 30 分間反応させた。

この後、ファルマシア製 S e p h a d e x G - 25 を充填し、
20 5 mM E D T A を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6
.0 で平衡化した直径 1 cm 長さ 45 cm のカラムに適用し、スル
フヒドリル基導入抗 H B s - I g G · 9.74 mg を得た。Y. Oku
らの方法 (Microbiol. Immunol., 32, 807-816, 1988) の方法に
従いスルフヒドリル基を定量したところ、I g G 1 分子あたり 2
25 .84 分子のスルフヒドリル基が導入されていることが確認できた
。

一方、ペア 1 - 303 nmol を含む 0.1 M 3 - モルホリノ

プロパンスルフォニックアシド（以下、MOPS）緩衝液pH7.
0 0.8mlに、N-(ε-マレイミド-カプロイルオキシ)スクシ
ンイミド（以下、EMCS）10mgを溶解した300μlのDMFを添加し、37°C 30分反応させた。反応後、エタノール沈澱法によりマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを精製した。225nmolのオリゴヌクレオチドが回収され、マレイミド基を定量したところ、オリゴヌクレオチド1分子あたり1.2分子のマレイミド基が導入されていることが確認できた。

次に、得られたスルフヒドリル基導入抗HBs-IgGとマレイ
10 ミド基導入オリゴヌクレオチドを混合し、37°C 1時間反応させ、
5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH6
.0で平衡化した直徑1.5cm長さ45cmのカラムに適用した。
。分画したフラクションについて280nmと260nmにおける
吸光度を測定しオリゴヌクレオチド標識抗HBs-IgGに相当す
15 るフラクションを収集し、アミコン社製限外濾過膜YM-30によ
り濃縮した。

この収集した分画についてピアス社のBCAプロテインアッセイ
キットを用いてタンパク定量を行い、濃度が2.12mg/mlである
ことがわかった。以下この複合体を「ペア1-標識化抗HBs
20 - IgG」と略記する。

これと同様の方法により、前記工程2で得られたマウスモノクロ
ーン抗CRP-IgGにペア8+を導入してなるペア8+標識化抗
CRP-IgG、牛血清アルブミン（以下BSA）にペア1-を導
入してなるペア1-標識化BSA、及び抗HBs-IgGにPair
25 1+を導入してなるペア1+標識化抗HBs-IgGを調製した
。

工程5：オリゴヌクレオチド標識化抗HBs-Fab'の調製

前記工程 2 で得られたウサギポリクローン抗 H B s - I g G 1
2. 72 mg を 0. 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4. 5 に溶解
した。ここに 0. 25 mg のペプシン（ベーリンガーマンハイム社
製）を添加して 37°C 15 時間反応させた。反応後、5 mM E D
5 T A を含む 0. 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6. 0 で平衡化
した直径 1. 5 cm 長さ 45 cm の IBF biotechniques 社製 Ult r
o g e l A c A 44 樹脂を充填したカラムに適用した。F (a b
')² に相当する画分を収集し、これを濃縮した。ここで得た F (a b
')² の内 4. 94 mg に終濃度が 10 mM になるようにメ
10 ルカプトエチルアミンを添加し、37°C 90 分間反応させた。反応
後、5 mM EDTA を含む 0. 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH
15 6. 0 で平衡化した直径 1 cm 長さ 45 cm の Sephadex
G-25 を充填したカラムに適用した。ヒンジ部スルフヒドリル
基が露出した F a b' に相当する画分を収集し、YM-30 により
濃縮してスルフヒドリル基導入 F a b' を得た。3. 3 mg の F a
b' が回収された。また、スルフヒドリル基の定量を行ったところ
、1 分子の F a b' に対して 1. 12 分子のスルフヒドリル基が導
入されていることがわかった。

一方、ペア 1+ のオリゴヌクレオチド 250 nmol を 1 mM
20 EDTA を含む 0. 1 M MOPS 緩衝液 pH 7. 0 に溶解し、
これに 7. 7 mg の EMC S を含む DMF を添加し、37°C 1 時間
反応させた。エタノール沈澱によりマレイミド基導入オリゴヌクレ
オチドを精製し、5 mM EDTA を含む 0. 1 M リン酸ナトリ
ウム緩衝液 pH 6. 0 に溶解した。回収されたマレイミド基導入
25 オリゴヌクレオチドは 231 nmol で、1 分子のオリゴヌクレオ
チドに 0. 73 分子のマレイミド基が導入されていることがわかつ
た。

得られたスルフヒドリル基導入 F a b' とマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを混合し、37°C 1時間反応させ、反応後、5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.0 で平衡化した直徑 1.5 cm 長さ 45 cm の Ultrogel Ac 5 A 44 を充填したカラムに適用した。分画したフラクションについて 280 nm と 260 nm における吸光度を測定し、オリゴヌクレオチド標識化抗 H B s - F a b' に相当するフラクションを収集し、限外濾過膜（アミコン社製 YM-30）により濃縮した。この収集した分画についてプロテインアッセイキット（ピアス社製 B C A 10 プロテインアッセイキット）を用いてタンパク定量を行い、濃度が 5.72 mg/ml であることがわかった。

工程 6：固相化アビジンの調製

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬（株）製 PBS (-) ）20 ml に 10 mg のアビジンを溶解し、5 × 10 cm に切断したメンブレン（ミリポア社製 S P H F メンブレン）を室温でこの溶液中に 1 時間浸し、その後蒸留水でメンブレンを洗浄した。洗浄後、風乾し、前記工程 1 で調製した 258 nmol / ml の濃度のビオチン標識ペア 1- をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5 cm の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、ビオチン標識ペア 1- をアビジン結合 S P H F メンブレンに結合させた。風乾後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）によりブロッキングを室温で 30 分行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、その後風乾してペア 1- 結合メンブレンを得た。次いで、ペーパーカッターにより幅 0.5 cm 縦 5 cm になるように切断し、一端にグラスフィルター（ワットマン社製、以下、G F）をホッチキスにより固定し乾燥条件下保存した。

工程 7：サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬（株）製 P B S (-)）に 0. 1 % B S A、0. 3 5 M 塩化ナトリウムを添加した溶液（以下、M P B S）を用いて、前記工程 4において調製した、ペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G を終濃度 1. 5 4 μ g / m l になるように、また、前記工程 3において調製した金コロイド（金コロイド標識化抗 H B s 抗体）は 5 2 0 n mにおける吸光度が 0. 5 になるように調製した。ここに H B s 抗原がそれぞれ終濃度 1 0 0 n g / m l、5 0 n g / m l、あるいは 0 n g / m l になるように加え、このうち 1 0 0 μ l を試験管に分注した。前記工程 6において調製したペア 1 - 結合メンブレンを、G F が上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、H B s 終濃度 1 0 0 n g / m l と 5 0 n g / m l において反応性が確認された。対象とした H B s を含まない溶液（0 n g / m l）では反応性は確認されなかった。この結果は、ペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G と H B s 抗原と金コロイド標識化抗 H B s 抗体とから、サンドイッチ免疫複合体が形成され、該サンドイッチ免疫複合体中のペア 1 + と、ペア 1 - 結合メンブレンのペア - とが相補的に結合され、該サンドイッチ免疫複合体がメンブレンに捕獲されたことを示す。

実施例 2

工程 1 : ペア 1 + 標識化アビジン及びペア 1 - 標識化アビジンの調製

前記実施例 1 の工程 1において調製したビオチン標識ペア 1 + 1 1 2 n m o l とアビジン 1. 5 2 m g を M P B S 0. 7 m l 中で 3 7 °C 3 時間反応させ、その後、P B S で平衡化した IBF biotechniques社製 U l t r o g e l A c A 4 4 樹脂に適用し、ペア 1 + 標識化アビジンを得た。また、同様の方法により、ペア 1 - 標識化アビジンを得た。

工程 2 : オリゴヌクレオチドーアビジンマトリクス結合メンブレンの調製

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬製 P B S (-)）20 m l に 1
0 m g のアビジンを溶解し、5 × 10 c m に切断したメンブレン（
5 ミリポア社製 S P H F メンブレン）を室温で 1 時間この溶液中に
浸し、その後蒸留水でメンブレンを洗浄した。洗浄後、風乾し、実
施例 1 で調製した 258 n m o l / m l の濃度のビオチン標識化ペ
ア 1 - をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、
5 c m の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、ビオチン標
10 識化ペア 1 - をアビジン結合 S P H F メンブレンに結合させた。風
乾後、プロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）により
プロッキングを室温で 30 分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し
、ペア 1 - 結合 S P H F メンブレンを調製した。本実施例 2 の前記
工程 1 で調製したペア 1 + 標識化アビジン 1 μ g / m l とペア 1 -
15 標識アビジン 2 μ g / m l を含む M P B S にペア 1 - 結合 S P H F
メンブレンを室温下 1 時間反応させ、オリゴヌクレオチドーアビジ
ンマトリクス結合メンブレンを調製した。メンブレンを蒸留水で洗
浄後、風乾した。その後、ペーパーカッターにより幅 0.5 c m 縦
5 c m になるように切断し、一端に G F をホッチキスにより固定し
20 乾燥条件下保存した。

工程 3 : サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

M P B S を用いて、前記実施例 1 の工程 4 において調製した、ペ
ア 1 + 標識化抗 H B s - I g G を終濃度 1.54 μ g / m l になる
ように、また、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロイド
25 標識化抗 H B s 抗体は 520 n m における吸光度が 0.5 になるよ
うに調製した。ここに H B s 抗原がそれぞれ終濃度 100 n g / m
l 、 80 n g / m l 、 60 n g / m l 、 40 n g / m l 、 20 n g

／m l、あるいは0 ng／m lになるように加え、このうち100 μlを試験管に分注した。本実施例2の前記工程2において調製したオリゴヌクレオチドーアビジンマトリクス結合メンブレンを、GFが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果5、HBs終濃度100ng／m l、80ng／m l、60ng／m lにおいて反応性が確認された。40ng／m l以下の濃度では反応性は確認されなかった。

実施例3

工程1：ペア1-結合SPHFメンブレンの調製

前記実施例1の工程4で調製した2mg／m lの濃度のペア1-標識化BSAをソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5×10cmに切断したメンブレン（ミリポア社製 SP HFメンブレン）の5cmの辺に対して2等分するように直角に線を引き、物理吸着によりメンブレンに結合させた。風乾後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）によりブロッキングを室温で30分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、ペア1-結合15 SP HFメンブレンを調製した。風乾後、ペーパーカッターにより幅0.5cm縦5cmになるように切断し、一端にGFをホッチキスにより固定し乾燥条件下保存した。

工程2：サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

M PBSを用いて、前記実施例1の工程4において調製した、ペア1+標識化抗HBs-IgGを終濃度1.54μg／m lになるように、また、前記実施例1の工程3において調製した金コロイド（金コロイド標識化抗HBs抗体）は520nmにおける吸光度が250.5になるように調製した。ここにHBs抗原がそれぞれ終濃度100ng／m l、50ng／m l、25ng／m l、10ng／m l、5ng／m lあるいは0ng／m lになるように加え、この

うち $100\mu\text{l}$ を試験管に分注した。本実施例3の前記工程1において調製したペア1-結合SPHFメンブレンを、GFが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、HBs終濃度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 、 $50\text{ng}/\text{ml}$ 、 $25\text{ng}/\text{ml}$ 、 $10\text{ng}/\text{ml}$ 、 $5\text{ng}/\text{ml}$ において反応性が確認された。 $0\text{ng}/\text{ml}$ の濃度では反応性は確認されなかった。

実施例4

工程1：(ペア1-) + (抗HBs-IgG)結合SPHFメンブレンの調製

前記実施例1の工程4で調製した $0.5\text{mg}/\text{ml}$ の濃度のペア1-標識化抗HBs-IgGをソフトペン(プラチナ万年筆(株)製)に染み込ませて、 $5 \times 10\text{cm}$ に切断したメンブレン(ミリポア社製SPHFメンブレン)の 5cm の辺に対して2等分するように直角に線を引き、物理吸着により該メンブレンに結合させた。

風乾後、ブロッキング剤(雪印乳業(株)製ブロックエース)によりブロッキングを室温で30分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、(ペア1-) + (抗HBs-IgG)結合SPHFメンブレンを調製した。風乾後、ペーパーカッターにより幅 0.5cm 縦 5cm になるように切断し、一端にGFをホッチキスにより固定し乾燥条件下保存した。

工程2：サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

MPSを用いて、前記実施例1の工程5において調製した、ペア1+標識化抗HBs-Fab'を終濃度 $1.54\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、また、前記実施例1の工程3において調製した金コロイドは 520nm における吸光度が0.5になるように調製した。ここにHBs抗原がそれぞれ終濃度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 、 $50\text{ng}/\text{ml}$ 、 $25\text{ng}/\text{ml}$ 、 $10\text{ng}/\text{ml}$ 、 $5\text{ng}/\text{ml}$ 、 $2.5\text{ng}/\text{ml}$

/m lあるいは0 ng/m lになるように加え、このうち100 μlを試験管に分注した。前記実施例4において調製した(ペア1-) + (抗H Bs - Ig G)結合SPHFメンブレンを、GFが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、H Bs 終濃度100 ng/m l、50 ng/m l、25 ng/m l、10 ng/m l、5 ng/m l、2.5 ng/m lにおいて反応性が確認された。0 ng/m lの濃度では反応性は確認されなかった。

実施例5

分析装置の調製

図13は本実施例5で使用したストリップ状の分析装置である。図13のストリップにおいて、109はハイランド社製オーバーヘッドプロジェクター用フィルムであり、本実施例5の分析装置の補強用支持フィルムとして用いた。該支持フィルム109上に、両面テープ(ニチバン社製)107を介して、該両面テープ107の両端の部位を除いた全面に、ストリップ状のSPHFメンブレン102を貼着して展開要素を構成した。該SPHFメンブレン102は前記実施例1の工程6と同様の処理により調製したもので中間あたりの検出ゾーン106の位置にペア1-を結合させたものである。

該展開要素の一端に、ブロッキング剤(雪印乳業(株)製ブロックエース)により予めブロッキング処理を施した濾紙(アドバンテック社製)からなる適用ゾーン101を設け、さらに該適用ゾーン101と展開要素との間に試薬を含ませた封入ゾーン105を両者に緊密に接触させて、適用された液体試料が移動可能なように配置した。該封入ゾーン105は、ブロッキング剤(雪印乳業(株)製ブロックエース)により予めブロッキング処理を施したグラスペーパーシート(ミリポア社製)で製造されており、該封入ゾーン105には金コロイド標識化ウサギ抗H Bs - Ig G 103が0.

15 μg 、ペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G 1 0 4 が一定量含まれている。該金コロイド標識化ウサギ抗 H B s - I g G 1 0 3 は前記実施例 1 の工程 3 により調製したものであり、該ペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G 1 0 4 は前記実施例 1 の工程 4 において調製したものである。該展開要素の他端には、G F からなる吸収ゾーン 1 0 8 を配置した。このようにして得られた H B s 抗原検出のための分析装置のストリップの幅は 5 mm で、長さ 60 mm であり、これを乾燥条件下保存した。

分析例

10 本実施例 5 の前記工程で得られた H B s 抗原検出用の分析装置の適用ゾーン 1 0 1 に、H B s 抗原 1 0 0 ng / ml になるように調製した M P B S 1 0 0 μl を添加し、一方、別に用意した同じ H B s 抗原検出用の分析装置の適用ゾーン 1 0 1 に、何も含まない M P B S 1 0 0 μl を添加した。それぞれの分析装置において 30 分後反応性を確認した。H B s 抗原 1 0 0 ng / ml を添加したストリップは、検出ゾーン 1 0 6 に金コロイドの着色が認められたが、M P B S のみを添加したストリップについては着色は認められなかった。

実施例 6

分析装置の調製

20 ナイロンメンブレン（ポール社製のバイオダイン C）を 5 x 10 cm に切断し、20% E D C 溶液中に 15 分間浸漬し、蒸留水で洗浄後、風乾し、活性化バイオダイン C を調製した。この活性化バイオダイン C に、前記実施例 1 の工程 1 で調製した 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度のアミノ基-ペア 1 - をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5 cm の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、ペア 1 - をバイオダイン C に結合させた。このバイオダ

イン C を蒸留水で洗浄した後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製
ブロックエース）で 1 時間ブロッキングを行い、再び蒸留水で洗
浄後、風乾させた。風乾後、ペーパーカッターにより、幅 0.5 c
m 縦 5 cm になるように切断し、一端に G F をホッチキスにより固
5 定し、乾燥条件下で保存した。

このうようにして得られた H B s 抗原検出のための分析装置に対
して、M P B S を用いて、前記実施例 1 の工程 4 において調製した
、ペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G を終濃度 1.54 μg / m l に
なるように、また、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロ
10 イドは 520 nm における吸光度が 0.5 になるように調製した。

分析例

本実施例 6 の前記工程で得られた H B s 抗原検出用の分析装置の
適用ゾーンに、H B s 抗原がそれぞれ終濃度 20 μg / m l 、ある
いは 0 ng / m l になるように加え、このうち 100 μl を試験管
15 に分注した。本実施例 6 の前記工程で調製したペア 1 - 結合バイオ
ダイン C を、G F が上になるように速やかに投入し、反応性を確認
した。その結果、H B s 終濃度 20 μg / m l において反応性が確
認された。0 濃度では反応性は確認されなかった。

実施例 7

分析装置の調製

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬製 P B S (-) ） 20 m l に 1
0 mg のアビジンを溶解し、5 × 10 cm に切断した S P H F メン
ブレンを室温で 1 時間浸し、蒸留水で該メンブレンを洗浄した。洗
浄後、風乾し、前記実施例 1 の工程 1 で調製した 258 nmol /
25 m l の濃度のビオチン標識化ペア 1 - をソフトペン（プラチナ万年
筆（株）製）に染み込ませて、5 cm の辺に対して一端から 2 cm
のところに直角に線を引き、ビオチン標識化ペア 1 - をアビジン結

合 S P H F メンブレンに結合させた。同様に、ビオチン標識化ペア 8-をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5 cm の辺に対して別の一端から 2 cm のところに直角に線を引き、ビオチン標識化ペア 8-をアビジン結合 S P H F メンブレンに結合させた。ビオチン-アビジン結合により得られたペア 8- 固相化 S P H F メンブレンを風乾した後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製 ブロックエース）によりブロッキングを室温にて 30 分行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、その後風乾した。風乾後、ペーパーカッターにより幅 0.5 cm 縦 5 cm になるように切断し、一端にワットマン社製ガラスフィルター（以下 G F ）をホッチキスにより固定し乾燥条件下保存して、本実施例 7 で使用する分析装置とした。

分析例

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬（株）製 P B S (-) ）に 0.1% B S A 、 0.35 M 塩化ナトリウムを添加した M P B S を用いて、前記実施例 1 の工程 4 において調製した、ペア 1+ 標識化抗 H B s - I g G およびペア 8+ 標識化抗 C R P - I g G がそれぞれ終濃度 1.54 μg / m l になるように、また、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロイド標識化抗 H B s - I g G および金コロイド標識化抗 C R P - I g G は、 520 nm における吸光度がそれぞれ 0.5 になるように試験液溶液を調製した。

本実施例 7 の前記工程で得られた試験溶液に、 H B s 抗原、 C R P 抗原両方とも終濃度が 100 ng / m l になるように加えたもの、 H B s 抗原のみ終濃度が 100 ng / m l になるように加えたもの、 C R P 抗原のみ終濃度が 100 ng / m l になるように加えたもの、両方の抗原とも含まないものの 4 種類の異なる検体を準備し、このうち 100 μl をそれぞれ別の試験管に分注した。本実施例

7 の前記工程で調製したペア 8 - 固相化 S P H F メンブレンからなる分析装置を、 G F が上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、両者を含む検体はペア 1 - 、ペア 8 - 両方の結合領域が着色した。 H B s 抗原のみを含む検体は、ペア 1 - 結合領域のみが着色した。 C R P 抗原のみを含む検体は、ペア 8 - 結合領域のみが着色した。また、両者とも含まない検体は、ペア 1 - 、ペア 8 - 両方の結合領域とも着色しなかった。

実施例 8

分析装置の調製

図 1 4 ~ 図 1 6 は本実施例 8 に使用した分析装置を示し、図 1 4 はその分析装置の長手方向切断面、図 1 5 は側面図、図 1 6 は上面図を示す。図 1 4 ~ 図 1 6 において 2 0 1 はプラスチック製のケースであり、上部ケース 2 0 2 と、下部ケース 2 0 3 に分解できる。下部ケース 2 0 3 に前記実施例 5 において調製したストリップ状の分析装置を設置し、上部ケース 2 0 3 を被せて一体化させた。

さらに、該ストリップ状の分析装置の適用ゾーンと検出ゾーンの位置に対応する上部ケース 2 0 2 の部位には、それぞれ試料適用口 2 0 4 及び検出窓 2 0 5 が空いている。該ケース 2 0 1 中に前記実施例 5 で調製したストリップ状の分析装置が配設することによって 20 本実施例 8 の H B s 抗原検出用分析装置を得た。このデバイスは乾燥条件下保存した。

分析例

本実施例 8 の前記工程で調製した H B s 抗原検出用分析装置の、試料適用口 2 0 4 に H B s 抗原 1 0 0 n g / m l になるように調製 25 した M P B S 1 0 0 μ l を添加し、および別に用意した同じ H B s 抗原検出用分析装置に対して、何も含まない M P B S 1 0 0 μ l を添加し、それぞれ 3 0 分後に検出窓 2 0 5 から観察できるペア 1 -

を結合させた検出ゾーン 106 の反応性を確認した。H B s 抗原 100 n g / m l を添加した分析装置の方は、金コロイドの着色が認められたが、M P B S のみを添加した分析装置については着色は認められなかった。

5 比較例 1

本比較例 1 は抗体を結合子として検出ゾーンに固定化した従来法による検出感度と本発明による検出感度の比較のためのものである。

分析装置の調製

10 0. 2 m g / m l の濃度のウサギ抗 H B s - I g G をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5 × 10 cm に切断したメンブレン（ミリポア社製 S P H F メンブレン）の 5 cm の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、物理吸着によりウサギ抗 H B s - I g G を S P H F メンブレンに結合させた。風乾後、
15 ブロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）によりブロッキングを室温で 30 分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、ウサギ抗 H B s - I g G 結合 S P H F メンブレンを調製した。風乾後、ペーパーカッターにより幅 0. 5 cm 縦 5 cm になるように切断し、一端に G F をホッチキスにより固定し乾燥条件下保存して本比較
20 例 1 の分析装置とした。なお、0. 2 m g / m l を越える濃度のウサギ抗 H B s - I g G を用いた場合は、非特異反応が高くなるために、0. 2 m g / m l のウサギ抗 H B s - I g G を用いた。

分析例

従来法による検出感度は以下のようない実験により評価した。すな
25 わち、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロイドは 520 nm における吸光度が 0. 5 になるように試薬溶液を調製した。得られた試薬溶液に、H B s 抗原がそれぞれ終濃度 100 n g / m l

、 $50\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $25\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $10\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $5\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $2.5\text{ ng}/\text{m l}$ あるいは $0\text{ ng}/\text{m l}$ になるように加えた。

得られた各試薬－抗原混合液について $100\mu\text{l}$ を各試験管に分注した。本比較例1の前記工程において調製した抗H B s－I g G結合S P H F メンブレンからなる本比較例1の分析装置を、G Fが上になるように、本比較例1の前記工程で調製した抗原溶液と試薬混合溶液が収容されている試験管中に速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、H B s 終濃度 $100\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $50\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $25\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $10\text{ ng}/\text{m l}$ において反応性が確認された
10 $10\text{ ng}/\text{m l}$ 未満の濃度では反応性は確認されなかった。

一方、本発明による方法の検出感度は以下のようない実験により評価した。すなわち、M P B S を用いて、前記実施例1の工程5において調製した、ペア1+標識抗H B s－F a b' を終濃度 $1.54\mu\text{g}/\text{m l}$ になるように、また、前記実施例1の工程3において調製した金コロイドは 520 nm における吸光度が 0.5 になるよう試薬溶液を調製した。得られた試薬溶液にH B s 抗原がそれぞれ終濃度 $100\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $50\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $25\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $10\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $5\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $2.5\text{ ng}/\text{m l}$ あるいは $0\text{ ng}/\text{m l}$ になるように加えた。

得られた各試薬－抗原混合溶液について $100\mu\text{l}$ を各試験管に分注した。前記実施例4において調製した(ペア1-) + (抗H B s－I g G)結合S P H F メンブレンを、G Fが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、H B s 終濃度 $100\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $50\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $25\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $10\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $5\text{ ng}/\text{m l}$ 、 $2.5\text{ ng}/\text{m l}$ において反応性が確認された。 $0\text{ ng}/\text{m l}$ の濃度では反応性は確認されなかった。

以上の結果より、本発明による核酸を結合子及び抗結合子とした

分析装置による場合、従来の免疫化学的活性物質を結合子及び抗結合子としたものよりも4倍検出感度が高いことがわかった。

産業上の利用可能性

5 本発明によれば、固相化された抗結合子としての核酸と、生成された複合体に含まれる結合子としての核酸との相補的結合は、一致率が高く、安定性の高い反応であり、免疫反応よりも強力に行えるために、分析物を含む生物学的親和性物質複合体は効率よく固相に結合させることができる。また、抗結合子としての核酸の固相化において、他の物質、例えば、タンパク質等の高分子等を介して核酸を結合させた場合、タンパク質に比べて、小さい分子の核酸をタンパク質に結合することができ、しかも、タンパク質分子よりも多くの数の核酸分子（抗結合子）を結合させることができる。したがって、分析物を含む生物学的親和性物質複合体をより多く捕獲することが可能となり、従来のイムノクロマト法よりも高感度化が実現できる。

本発明によれば、マーカー標識化第一配位子と核酸標識化配位子と分析物との反応によって生成される複合体を、クロマト的に移動させて、検出ゾーンにおいて捕獲してその量を測定或いはその存在を検出するのに、固相化された核酸と、生成された複合体に含まれる核酸との相補的結合により捕獲しているので、1種類以上乃至無限に近い数までの分析物を分析物の種類毎にゾーンを形成して測定或いは検出することができる。

本発明の簡易臨床診断方法によれば、固相化された核酸と、生成された複合体に含まれる核酸との相補的結合において、相互の核酸の相補的塩基の一致率を変化させることにより、分析物を測定又は検定するときの検出感度のコントロールの調整を行なうことが

できる。このような特徴は、同時に複数項目を判定する必要がある場合は、それぞれの項目の正常域、異常域が異なっており、抗体の濃度、量を変化させるといったことが必要とされるケースに特に有利である。

5

10

15

20

25

請求の範囲

1. 液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、

5 (1) 第一配位子にマーカーが結合されてなる 1 種類以上のマーカー標識化配位子を含み、且つ第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる 1 種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬と、

10 1 種類以上の分析物を含む液体試料を接触させて、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマーカー標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体を 1 種類以上形成させること、

15 (2) 形成された 1 種類以上の複合体を、シート状の展開要素中に毛管現象により展開させること、

(3) 前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に前記複合体を捕獲して各々独立した 20 帯を形成させること、

(4) 前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカーを測定又は検定することを含むこと、
からなる分析方法。

25 2. 液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、

(1) 1 種類以上の分析物を含む液体試料をシート状の展開要素

に適用して、展開要素中を毛管現象により展開させること、

(2) 分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる1種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応するこ
5 とができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬成分が封入されている封入ゾーンに前記液体試料を移動させ接触させること、

(3) 前記試薬と液体試料との接触により形成された、特定の種
10 類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマー
カーラー標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の
種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体の1種類以
上、或いは形成されつつある反応物を毛管現象により該展開要素中
に展開させること、

15 (4) 前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する
核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定さ
れてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補
的結合により分析物の種類毎に形成された前記複合体を捕獲して各
々独立した帯を形成させること、

20 (5) 前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカーを測定
又は検定することを含むこと、
からなる分析方法。

3. 分析物を測定又は検定するときの検出感度のコントロールは
25 結合子と抗結合子を構成する互いの核酸の塩基配列の相補的な一致
率をコントロールすることによって行う請求項1又は2記載の分析
方法。

4. 前記第一配位子及び第二配位子が免疫化学的活性物質である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

5 5. 前記第一配位子と第二配位子が同一の反応性を有する物質である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

6. 前記第一配位子と第二配位子が異なる反応性を有する物質である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

10

7. 前記第一配位子及び第二配位子が核酸であり、
該第一配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有し、
該第二配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

15 20

8. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の 5' 末端、 3' 末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入された官能基を介して、展開要素としての不溶性支持体の官能基と共有結合させたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

25

9. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の 5' 末端或いは 3' 末端に導入されたビオチン又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入されたビオチンを介して、展開要素としての不溶性支持体に予め固定させたアビジン又はストレプトアビジンと結合させたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

10. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の 5' 末端、 3' 末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入された官能基を介してタンパク質と結合されてなる核酸結合タンパク質を、展開要素としての不溶性支持体に結合させたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

11. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を牛血清アルブミンに結合させたものである請求項 10 記載の分析方法。

10

12. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を免疫グロブリンに結合させたものである請求項 10 記載の分析方法。

15

13. 前記タンパク質は、分析物に対して免疫化学的活性を有するものである請求項 10 又は 12 記載の分析方法。

14. 前記マーカーが金属コロイド、着色ラテックス及び着色リポソームから選ばれたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

20
25

15. 試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析キットであって、該キットは、試薬、及び該試薬とは別体の分析装置から構成され、

前記試薬は、分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる 1 種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる 1 種類以

上の結合子標識化配位子を含む試薬であり、

前記分析装置は、シート状の展開要素を有し、該展開要素は毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開でき、前記別体の試薬に含まれる結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる1種類以上の抗結合子が、種類毎に独立して該展開要素の検出ゾーンに固定されてなるものであり、該検出ゾーンにおいて、該結合子との核酸の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させることができる分析キット。

10

16. 請求項15記載の診断キットに使用される分析装置。

17. 試料中に存在する1種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析装置であって、該装置は、

15 (1) 毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開できるシート状の展開要素、

(2) 前記シート状の展開要素の一端に位置し、液体試料を外部から受入れ可能で、受入れた液体試料を他方端に達するのに充分な供給能力を持ち、後記する試薬が封入された封入ゾーンに対して分析すべき液体試料を供給することが可能で、該液体試料を外部から受け入れるための適用ゾーン、

(3) 分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる1種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬が含まれている前記展開要素の前記適

用ゾーンに近い位置に配置された封入ゾーン、

(4) 前記展開要素中を拡散してきた分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を受け入れることができ、且つ前記適用ゾーンとは離れた位置に配置された吸水ゾーン、

5 (5) 前記封入ゾーンと前記吸水ゾーンとの間に位置し、前記結合子に対して相補的な塩基配列を有する抗結合子が1種類以上独立して固定されており、分析物の種類毎にマーカー標識化配位子、分析物、及び結合子標識化配位子から形成された複合体を捕捉して検出できる検出ゾーン、

10 を含む分析装置。

18. 前記第一配位子及び第二配位子が免疫化学的活性物質である請求項16又は17記載の分析装置。

15 19. 前記第一配位子及び第二配位子が同一の反応性を有する物質である請求項16又は17記載の分析装置。

20. 前記第一配位子及び第二配位子が異なる反応性を有する物質である請求項16又は17記載の分析装置。

20

21. 前記第一配位子及び第二配位子が核酸であり、

該第一配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有し、

25 該第二配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有することを特徴とする請求項16又は17記載の分析装置。

22. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の5'末端、3'末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入された官能基を介して、展開要素としての不溶性支持体の官能基と共有結合させたものである請求項16又は17記載の分析装置。
5

23. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の5'末端或いは3'末端に導入されたビオチン又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入されたビオチンを介して、展開要素としての不溶性支持体に予め固定させたアビジン又はストレプトアビジンと結合させたものである請求項16又は17記載の分析装置。
10

24. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の5'末端、3'末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入された官能基を介してタンパク質と結合されてなる核酸結合タンパク質を、展開要素としての不溶性支持体に結合させたものである請求項16又は17記載の分析装置。
15

20 25. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を牛血清アルブミンに結合させたものである請求項24記載の分析装置。

26. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を免疫グロブリンに結合させたものである請求項24記載の分析装置。
25

27. 前記タンパク質は、分析物に対して免疫化学的活性を有するものである請求項24又は26記載の分析装置。

28. 前記マーカーが金属コロイド、着色ラテックス及び着色リポソームから選ばれたものである請求項16又は17記載の分析装置。

5 29. 請求項16又は17記載の分析装置が不透湿性固体材料からなるケース中に配置されている分析装置。

10

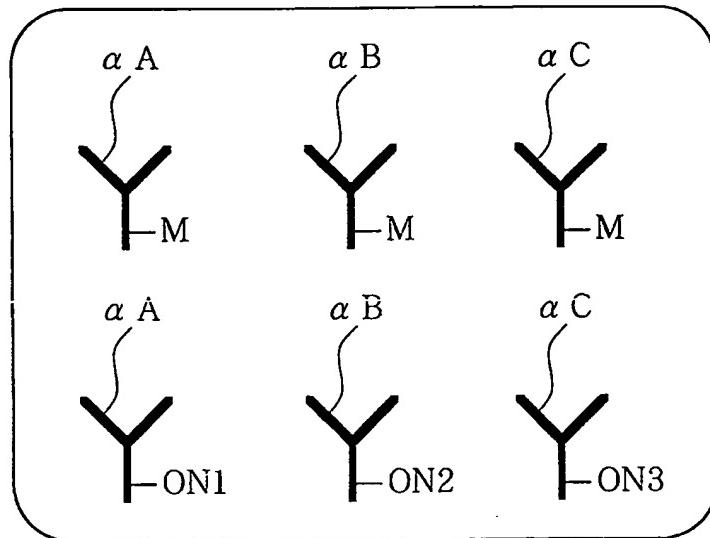
15

20

25

第 1 図

抗原 A、B、C が同時に検出可能な一種類以上の抗原分析試薬



$\alpha A, \alpha B, \alpha C$: 抗原 A,B,C に対する各々の抗体

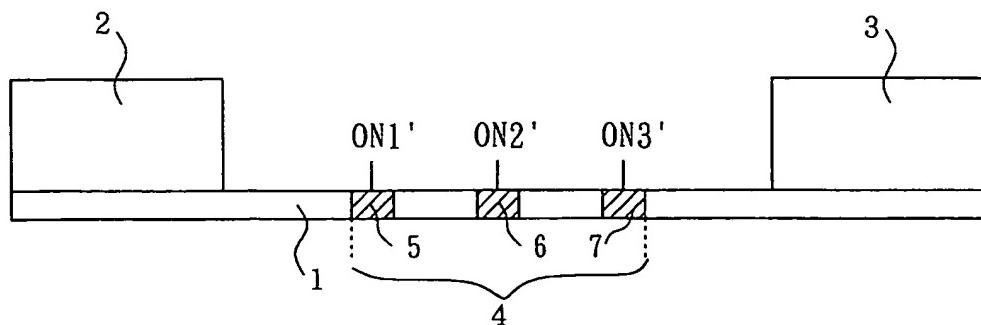
ON1 : ON2,ON3 とは異なる配列を持つ
オリゴヌクレオチド

ON2 : ON1,ON3 とは異なる配列を持つ
オリゴヌクレオチド

ON3 : ON1,ON2 とは異なる配列を持つ
オリゴヌクレオチド

M : マーカー

第 2 図

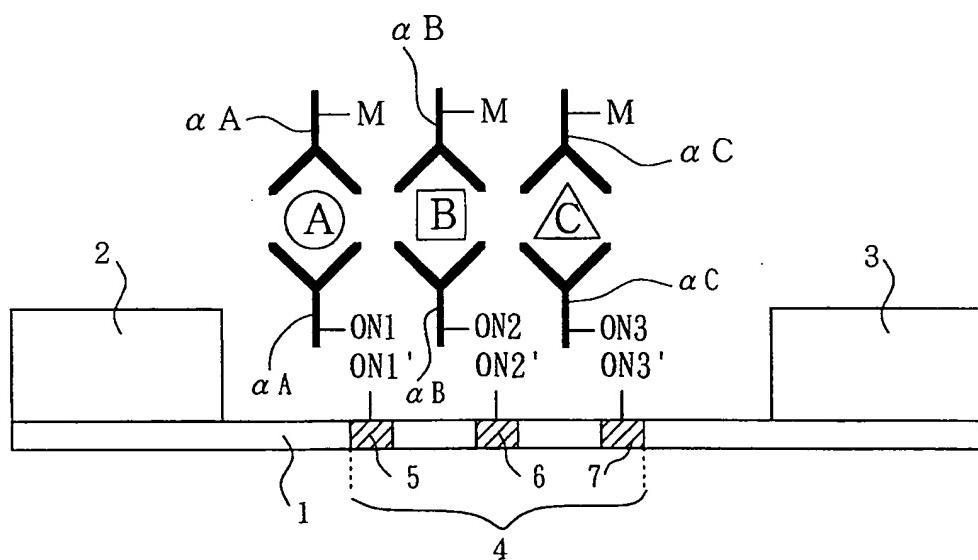


ON1'： ON1 に相補的塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

ON2'： ON2 に相補的塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

ON3'： ON3 に相補的塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

第 3 図

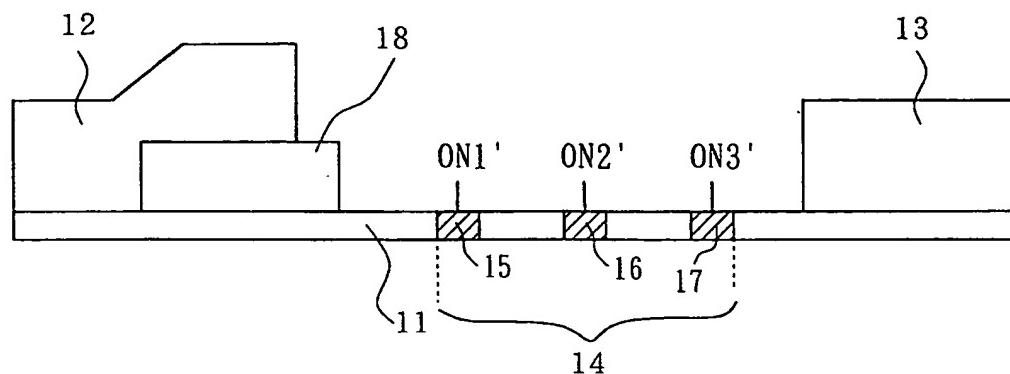


(A) : 抗原 A

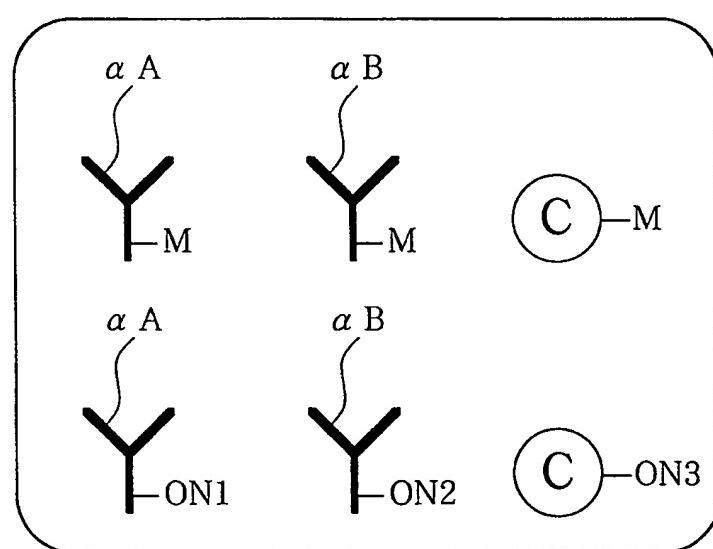
(B) : 抗原 B

(C) : 抗原 C

第 4 図



第 5 図



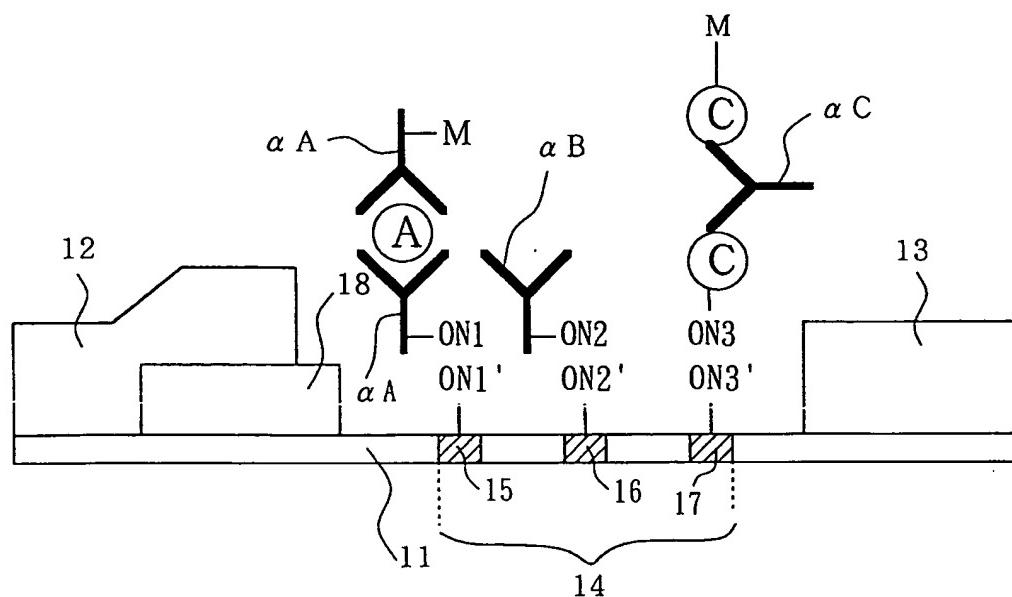
α A, α B : 図 1 と同じ

ON1, ON2, ON3 : と同じ

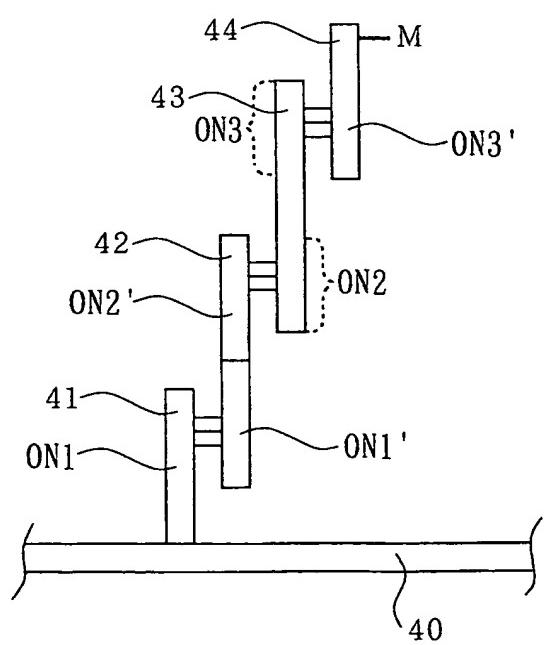
M : 図 1 と同じ

(C) : 抗原 C

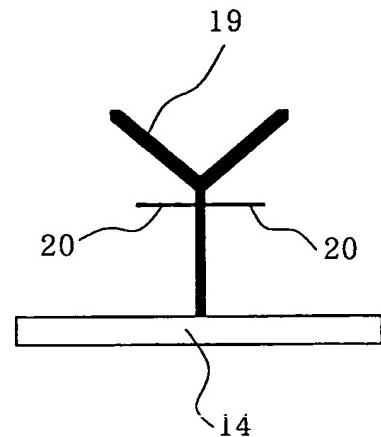
第 6 図



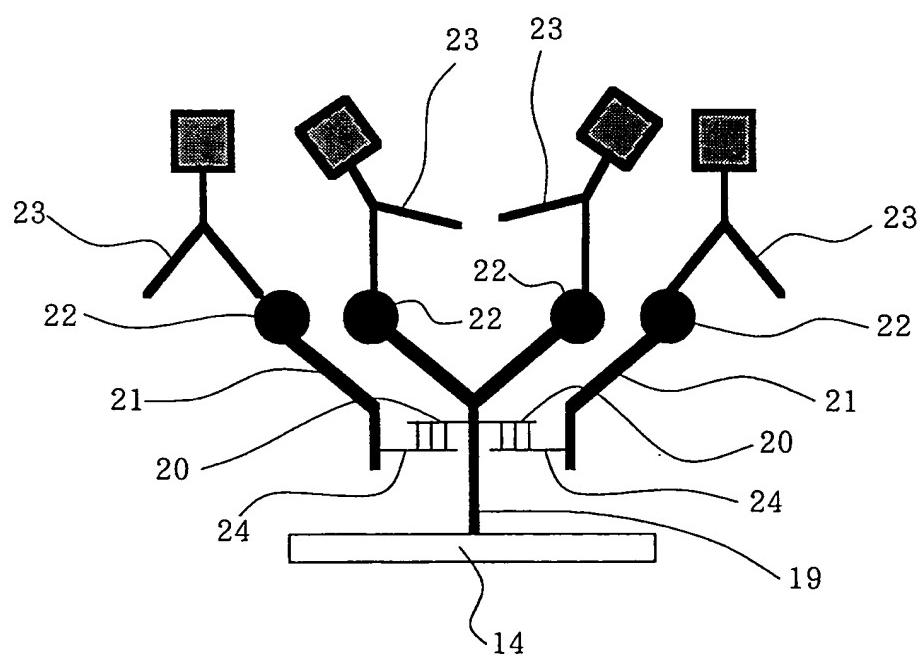
第 7 図



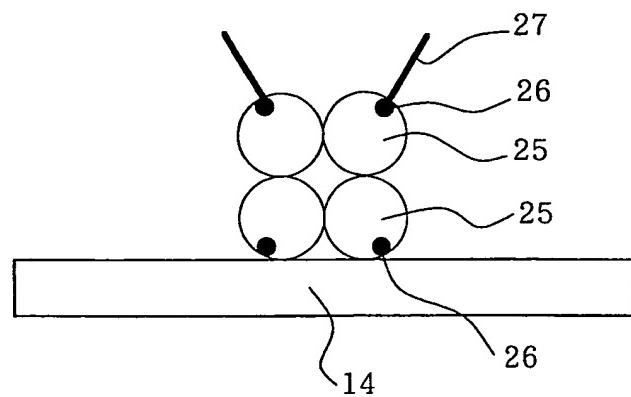
第 8 図



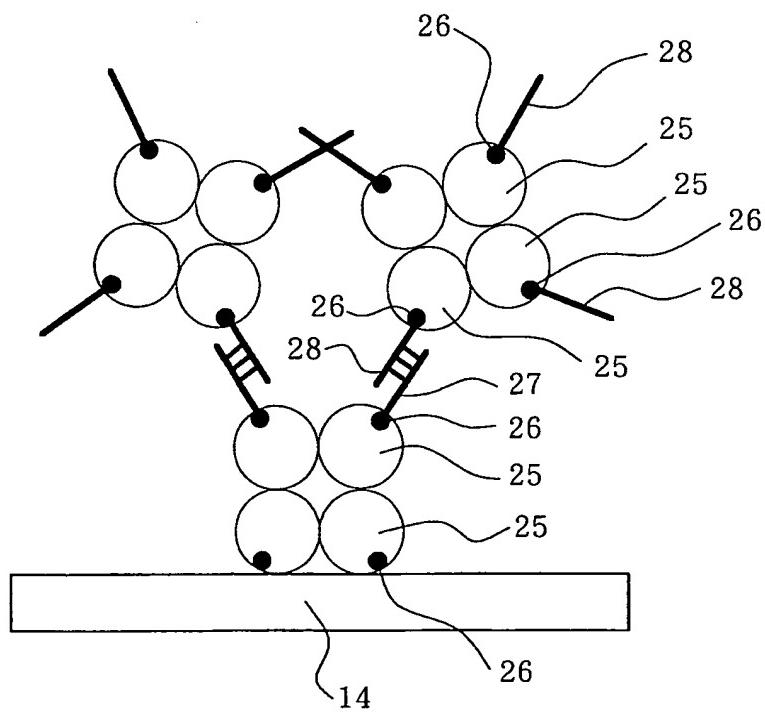
第 9 図



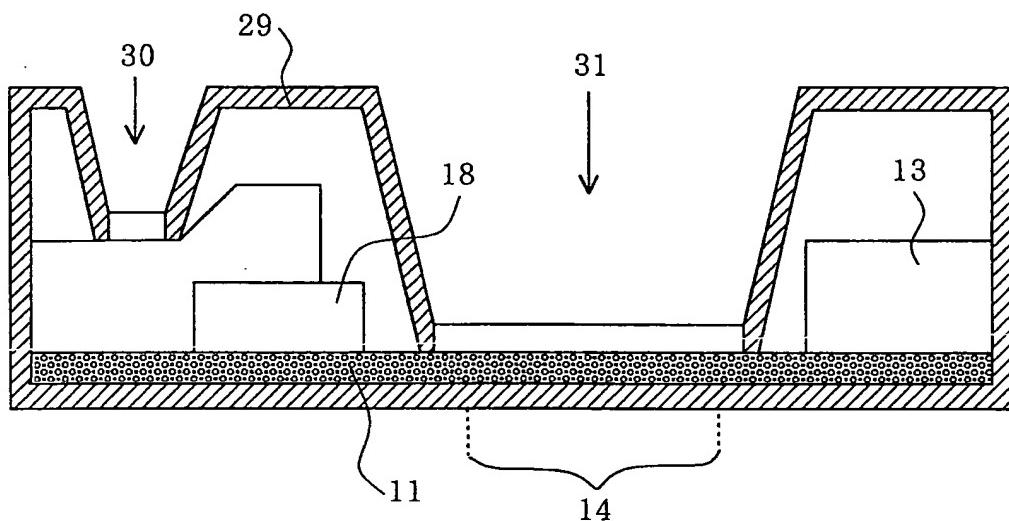
第 1 0 図



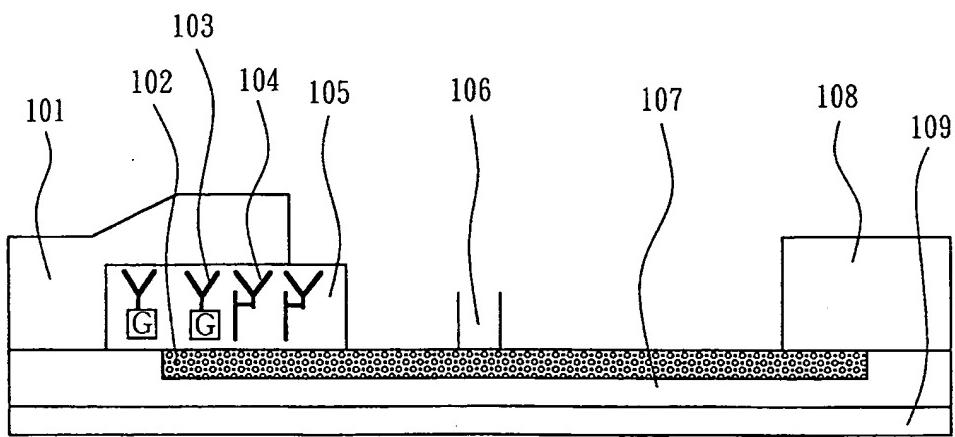
第 1 1 図



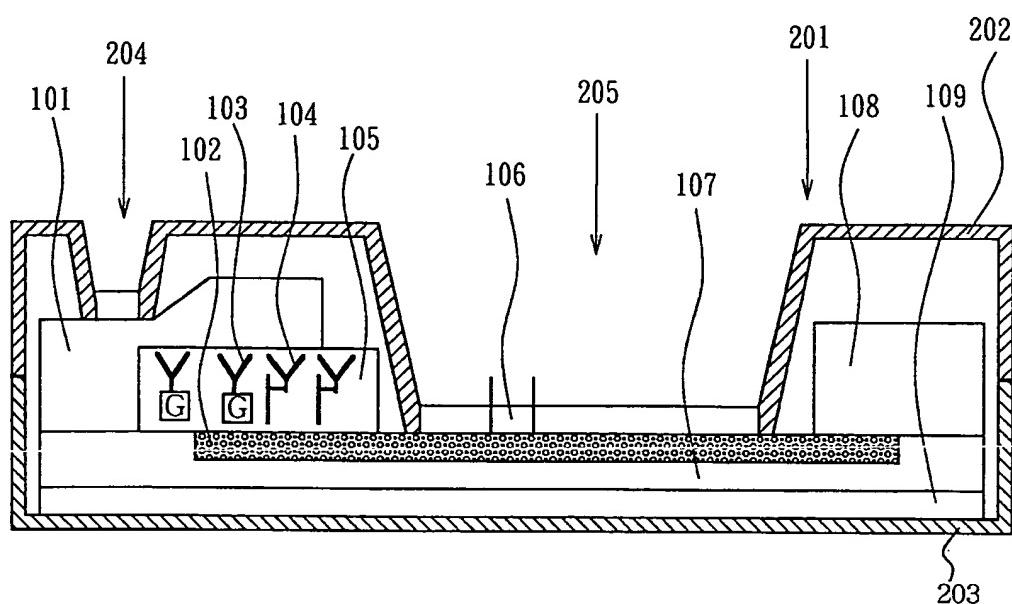
第 1 2 図



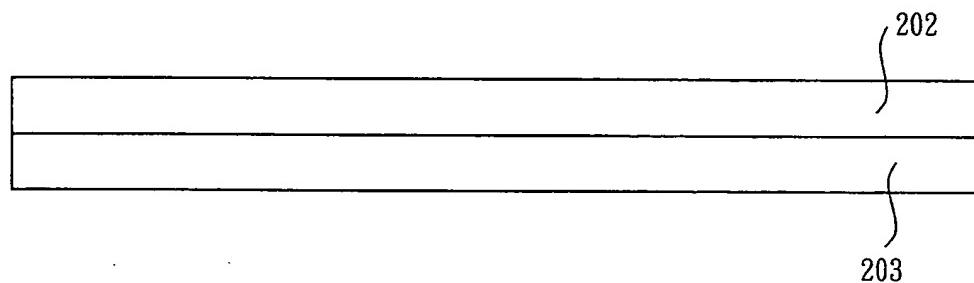
第 1 3 図



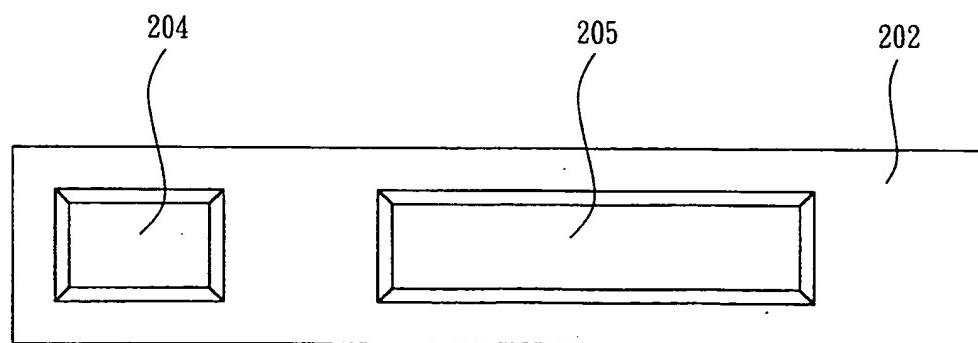
第 1 4 図



第 1 5 図



第 1 6 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N33/543Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1940-1998 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 8-94618, A (Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.), April 12, 1996 (12. 04. 96) (Family: none)	1-29
Y	JP, 6-186232, A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), July 8, 1994 (08. 07. 94) (Family: none)	1-29
Y	WO, 94/27150, A1 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), November 24, 1994 (24. 11. 94) & EP, 698792, A	1-29

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search May 6, 1998 (06. 05. 98)	Date of mailing of the international search report May 19, 1998 (19. 05. 98)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.C1° G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.C1° G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1998年
日本国公開実用新案公報 1971-1998年
日本国登録実用新案公報 1994-1998年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 8-94618, A (わかもと製薬株式会社) 12. 4月. 1996 (12. 04. 96) (ファミリーなし)	1~29
Y	J P, 6-186232, A (三洋化成工業株式会社) 8. 7月. 1994 (08. 07. 94) (ファミリーなし)	1~29
Y	WO, 94/27150, A1 (日本製薬株式会社) 24. 11月. 1994 (24. 11. 94) & EP, 698792, A	1~29

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 05. 98

国際調査報告の発送日

19.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

亀田 宏之 印

2 J 9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252